

09/849,980

09/381810 20.04.98

日本国特許庁  
PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 19 JUN 1998  
WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて  
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed  
with this Office.

出願年月日

Date of Application:

1997年 3月28日

出願番号

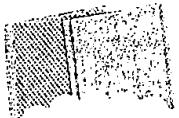
Application Number:

平成 9年特許願第094845号

出願人

Applicant(s):

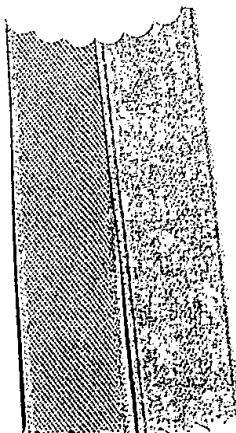
参天製薬株式会社



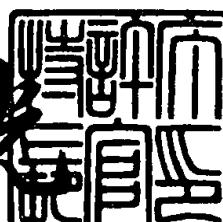
PRIORITY DOCUMENT

1998年 6月 5日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office



荒井寿光



出証番号 出証特平10-3042496

【代理人】

【識別番号】 100104813

【弁理士】

【氏名又は名称】 古谷 信也

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 033891

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【物件名】 委任状 1

【援用の表示】 平成9年3月28日提出の包括委任状

---

このような水チャンネル活性を有する膜タンパク質としては、アクアポリン（AQP）として知られている一群の膜タンパク質が単離されている。また、現在までに、幾つかのアクアポリンの遺伝子がクローニングされ、AQP1～5、F A-C H I P、A Q P-γ T I P等のアクアポリンが哺乳類、両生類、植物等から発見されている（例えば、佐々木成、「医学のあゆみ」、173巻、9号、1995年）。

#### 【0004】

アグレ（P. Agre）らは、SCIENCE誌（vol. 256、385～387頁、1992年）において、後にAQP1と称されることになるCHIP28のインビトロ転写RNAを注入されたアフリカツメガエル（*Xenopus laevis*）卵母細胞が水透過性を上昇させることを報告している。バンオスト（B. A. van Oost）らは、SCIENCE誌（vol. 264、92～95頁、1994年）において、ヒトAQP2のアミノ酸配列を開示し、このものがバソプレシンに依存した尿の濃縮に関与することを示唆している。

#### 【0005】

石橋らは、Proc. Natl. Acad. Sci. USA誌（91巻、6269～6273頁、1994年）において、腎集合管由来のAQP3の遺伝子の塩基配列を開示し、コードされるアミノ酸配列を記載している。石橋らは、AQP3のcRNAを注入したアフリカツメガエル卵母細胞の水透過性を測定して水チャンネル活性を確認している。石橋らは、このAQP3は、水のみならず、尿素やグリセロール等の非イオン性小分子をも輸送することを報告している。

#### 【0006】

ユング（J. S. Jung）らは、Proc. Natl. Acad. Sci. USA誌（91巻、13052～13056頁、1994年）において、AQP4を単離したことを報告している。このAQP4は、哺乳類の脳中に最も多量に存在し、水銀抵抗性を有することが知られている。レイナ（S. Raina）らは、J. Biol. Chem. 誌（270巻、1908～1912頁、1995年）において、ラットの唾液腺由来のAQP5のcDNAを調製し、その塩基配列及びコードするアミノ酸配列を開示している。レイナ（S. Raina）らは

リペプチドでもある。

以下、本発明を詳述する。

【0011】

本発明のポリペプチドは、配列表の配列番号1に示すアミノ酸配列を含む。このポリペプチドは、アスパラギン-プロリン-アラニンの3アミノ酸からなる配列をアミノ酸番号195～197に有している。しかし、従来知られているAQ Pに共通して見られるような、このアスパラギン-プロリン-アラニン配列が2度出現するという特徴は、本発明のポリペプチドにはみられない。上記ポリペプチドは、アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) 卵母細胞の水透過性を上昇させることから、水チャンネル活性を有するものであることを確認することができる。

【0012】

上記ポリペプチドは、このポリペプチドのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列に基づいて、*in vivo*又は*in vitro*に構成されたタンパク合成系により翻訳されて生成することができる。本発明のヌクレオチド配列は、上記ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする領域から実質的になり、必要に応じてプロモーター領域等のその他の領域を含んでいてもよい。遺伝情報に基づくタンパク合成は、遺伝子であるDNAの情報がRNAポリメラーゼによるDNAに依存するRNA合成の結果mRNAに転写される。そして、このmRNAが、tRNAを含むタンパク合成系でアミノ酸配列に翻訳される。従って、本発明のヌクレオチド配列は、DNA配列のみならず、RNA配列をも含むものである。また、あるアミノ酸に対応するコドンは、通常、1つ又は複数存在することが知られているので、上記ヌクレオチド配列は唯一のものではなく、同一のアミノ酸をコードする同義の他のコドンで置換されているヌクレオチド配列であってもよいことは当然である。

【0013】

上記ポリペプチドは、配列表の配列番号2に示すDNA配列が有する遺伝情報に基づいて形成することができる。上記ポリペプチドは、上記配列表の配列番号2に示す核酸塩基配列のうち、塩基番号173～1198でコードされている。

下、上記cDNAをヒト脂肪組織からクローニングして得る方法を、詳細に説明する。

## 【0016】

上記方法としては、例えば、Biochim. Biophys. Res. Commun., 221, 286-289 (1996) 等に記載されている方法等が知られている。これによれば、まず、脂肪組織から全RNAを分離し、必要に応じてポリ(A)RNAまで精製する。この精製には、市販の精製キットを使用することができ、例えば、オリゴ(dT)-セルロースと各種のバッファーとを組み合わせたファルマシア社製Quick prep mRNA purification kit等を好適に使用することができる。次に、2本鎖cDNAをpUC19系のベクタープライマーを用いて合成し、合成した2本鎖cDNAを制限酵素MboI(認識塩基配列:GATC)によって選択的に切断する。このとき、ベクター分子側のGATC配列は、dam<sup>+</sup>細菌中で複製することによってメチル化をうけてG<sup>M</sup>ATCとすることができますので、MboIで切断されることはない。切断されたcDNAをE. coliリガーゼによって自己環状化することにより、ポリ(A)から、最も近いMboI部位までのcDNAのフラグメントを含むプラスミドが完成する。このプラスミドを大腸菌に入れて培養し、形質転換させた大腸菌のコロニーを選択する。次に、適当なPCRプライマーを使用して上記コロニー中のcDNAをPCR法により増幅する。

## 【0017】

一方、pUC19系のベクタープライマーを用いて合成した全長の2本鎖cDNAをT4ポリメラーゼを用いて5'末端で切断し、T4リガーゼで環状化した後大腸菌に導入して形質転換させる。こうして形質転換させたコロニーから、上記3'-directed DNAライブラリーから上述の方法により得られた脂肪組織に特異的なcDNAをラベル化したものをプローブとして用いてスクリーニングすることにより、所望のコロニーを得る。このコロニー中の挿入cDNAを適当なPCRプライマーを使用してPCR法により増幅する。増幅産物を精製してソニケーションした後、M13ファージ中にサブクローニングする。

## 【0018】

## 実施例1

DNAの塩基配列の決定

最近、発現している遺伝子の同定だけではなく、その発現頻度や発現量の検討が可能な、RNAのポリ(A)からその上流の制限酵素MboI部位までの3'末端だけの決められた領域を含む3'-directed DNAライブラリー(Nature Genet., 2, 173-179 (1992))を用いて、脂肪組織に特異的なコラーゲン様因子のDNAをクローニングしたことが報告されている(Biochim. Biophys. Res. Commun., 221, 286-289 (1996))。上記報告に記載された方法に準じ、脂肪組織に特異的な3'-directed DNAライブラリーを用いて、本発明のDNAの塩基配列を決定した。

方法

ヒト脂肪組織からQuick prep mRNA purification kitを用いて分離・精製したポリ(A)<sup>+</sup> RNAに逆転写酵素を加えた後、pUC19系のベクターであるpBluescriptを含むλZAPIIに組み込んで大腸菌に導入した。そこへ、脂肪組織に特異的な部分DNAをプローブとしてスクリーニングを行い、形質転換された大腸菌のコロニーを得た。次いで、2種のプライマー(SK: 5' CGCTCTAGAACTAGTGGATC3'、T7: 5' GTAATACGACTCACTATAAGGGC3')とともにPCR(Polymerase Chain Reaction; 95°Cで30秒・50°Cで30秒・70°Cで60秒のサイクルを15サイクルした後、95°Cで30秒・70°Cで60秒のサイクルを15サイクル)を行い、ソニケーション処理をした後、M13にサブクローニングした。ここへプライマー色素を加え精製した後、自動シークエンサーでDNAの塩基配列を解析した。配列表の配列番号2に得られた塩基配列を示した。

【0023】

## 実施例2

水透過性についての検討

AQPファミリーの水透過性の検討については、AQPファミリーの遺伝子が

【表1】

	水透過性 (cm/sec)
RNA非導入群	30.0 × 10 <sup>-4</sup>
RNA導入群	292.5 × 10 <sup>-4</sup>

## 【0028】

表1から明らかなように、本発明のDNA配列がコードするポリペプチドは、卵母細胞に注入後、明瞭な水透過性の上昇をもたらした。このことから、本発明のポリペプチドは、水チャンネル活性を有することが判明した。

## 【0029】

## 【発明の効果】

本発明は、新規な水チャンネル活性を有するタンパク質及び上記タンパク質をコードする新規なDNA配列を提供することができる。上記タンパク質は、未だ水チャンネルの存在が報告されていないヒト脂肪組織中から見出されたものである。本発明により、上記組織が関与する水又は脂肪の代謝における疾患の新たな治療方法の開発が可能となる。

Tyr Leu Pro Asp His Met Thr Leu Trp Arg Gly Phe Leu Asn Glu Ala  
 165 170 175  
 Trp Leu Thr Gly Met Leu Gln Leu Cys Leu Phe Ala Thr Thr Asp Gln  
 180 185 190  
 Glu Asn Asn Pro Ala Leu Pro Gly Thr Glu Ala Leu Val Ile Gly Ile  
 195 200 205  
 Leu Val Val Ile Ile Gly Val Ser Leu Gly Met Asn Thr Gly Tyr Ala  
 210 215 220  
 Ile Asn Pro Ser Arg Asp Leu Pro Pro Arg Ile Phe Thr Phe Ile Ala  
 225 230 235 240  
 Gly Trp Gly Lys Gln Val Phe Ser Asn Gly Glu Asn Trp Trp Trp Val  
 245 250 255  
 Pro Val Val Ala Pro Leu Leu Gly Ala Tyr Leu Gly Gly Ile Ile Tyr  
 260 265 270  
 Leu Val Phe Ile Gly Ser Thr Ile Pro Arg Glu Pro Leu Lys Leu Glu  
 275 280 285  
 Asp Ser Val Ala Tyr Glu Asp His Gly Ile Thr Val Leu Pro Lys Met  
 290 295 300  
 Gly Ser His Glu Pro Thr Ile Ser Pro Leu Thr Pro Val Ser Val Ser  
 305 310 315 320  
 Pro Ala Asn Arg Ser Ser Val His Pro Ala Pro Pro Leu His Glu Ser  
 325 330 335  
 Met Ala Leu Glu His Phe  
 340  
 [0031]

配列番号：2

配列の長さ：1258

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

Tyr Leu Gly Val Asn Leu Gly Phe Gly Phe Gly Val Thr Met Gly Val  
 70 75 80  
 CAC GTG GCA GGC CGC ATC TCT GGA GCC CAC ATG AAC GCA GCT GTG ACC 466  
 His Val Ala Gly Arg Ile Ser Gly Ala His Met Asn Ala Ala Val Thr  
 85 90 95  
 TTT GCT AAC TGT GCG CTG GGC CGC GTG CCC TGG AGG AAG TTT CCG GTC 514  
 Phe Ala Asn Cys Ala Leu Gly Arg Val Pro Trp Arg Lys Phe Pro Val  
 100 105 110  
 TAT GTG CTG GGG CAG TTC CTG GGC TCC TTC CTG GCG GCT GCC ACC ATC 562  
 Tyr Val Leu Gly Gln Phe Leu Gly Ser Phe Leu Ala Ala Ala Thr Ile  
 115 120 125 130  
 TAC AGT CTC TTC TAC ACG GCC ATT CTC CAC TTT TCG GGT GGA CAG CTG 610  
 Tyr Ser Leu Phe Tyr Thr Ala Ile Leu His Phe Ser Gly Gly Gln Leu  
 135 140 145  
 ATG GTG ACC GGT CCC GTC GCT ACA GCT GGC ATT TTT GCC ACC TAC CTT 658  
 Met Val Thr Gly Pro Val Ala Thr Ala Gly Ile Phe Ala Thr Tyr Leu  
 150 155 160  
 CCT GAT CAC ATG ACA TTG TGG CGG GGC TTC CTG AAT GAG GCG TGG CTG 706  
 Pro Asp His Met Thr Leu Trp Arg Gly Phe Leu Asn Glu Ala Trp Leu  
 165 170 175  
 ACC GGG ATG CTC CAG CTG TGT CTC TTC GCC ATC ACG GAC CAG GAG AAC 754  
 Thr Gly Met Leu Gln Leu Cys Leu Phe Ala Thr Thr Asp Gln Glu Asn  
 180 185 190  
 AAC CCA GCA CTG CCA GGA ACA GAG GCG CTG GTG ATA GGC ATC CTC GTG 802  
 Asn Pro Ala Leu Pro Gly Thr Glu Ala Leu Val Ile Gly Ile Leu Val  
 195 200 205 210  
 GTC ATC ATC GGG GTG TCC CTT GGC ATG AAC ACA GGA TAT GCC ATC AAC 850  
 Val Ile Ile Gly Val Ser Leu Gly Met Asn Thr Gly Tyr Ala Ile Asn  
 215 220 225

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 水チャンネル活性を有する新規な膜タンパク質及びこれをコードするDNA配列を提供する。

【解決手段】 配列表の配列番号1に示すアミノ酸配列を含む水チャンネル活性を有する新規ポリペプチド、分子中に配列表の配列番号1に示すアミノ酸配列を含む水チャンネル活性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、配列表の配列番号2に示すDNA配列、及び、配列表の配列番号2に示す塩基配列のうち、塩基番号173～1198でコードされるアミノ酸配列を含む水チャンネル活性を有するポリペプチド。

【選択図】 なし

出願人履歴情報

識別番号 [000177634]

1. 変更年月日 1990年 8月 6日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府大阪市東淀川区下新庄3丁目9番19号

氏 名 参天製薬株式会社